

AH

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭57-141401

⑫ Int. Cl.³
C 08 B 37/00

識別記号

庁内整理番号
6580-4C

⑬ 公開 昭和57年(1982)9月1日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 4 頁)

⑭ 分子量分布幅を狭めたブルランの製造方法

⑮ 発明者 吉田幹彦

岡山市一宮15番地の5

⑯ 特 願 昭56-156134

⑰ 出願人 株式会社林原生物化学研究所

⑯ 特 願 昭55(1980)10月15日

岡山市下石井1丁目2番3号

⑯ 特 願 昭55-142953の分割

明細書

1. 発明の名称

分子量分布幅を狭めたブルランの製造方法

2. 特許請求の範囲

原料ブルランを部分分解した後、分画し、重量平均分子量／数平均分子量が15以下との画分を採取することを特徴とする分子量分子幅を狭めたブルランの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

ブルランは、オーレオバシディウム・ブルランス (*Aureobasidium pullulans*)を単糖類、少糖類などの糖類を含む栄養培地に好気的に培養して得られるグルカンであって、その化学構造は、主としてマルトトリオースが繰り返し α -1,6-グルコシド結合した線状高分子である。

ブルランは、工業的に分子量 80000~800000程度のものが製造、販売され、ブルランの持つてゐる水溶性、可食性、接着性、造膜性などの優れた性質が食品工業、化学工業などに広く利用されている。

本発明者は、ブルランの用途をさらに拡大するために、市販の各種重量平均分子量（以下、 M_w と示す）のブルランについて、ダルゼ過法により重量平均分子量／数平均分子量（以下、 M_w/M_n と示す）を調べたところ、何れも20以上と分子量分布幅の広いものであることが判明した。

そこで、本発明者は、分子量分布幅を狭めた高純度ブルランの製造方法、なかでも M_w/M_n が15以下のブルランの製造方法について鋭意研究した。

その結果、原料ブルランを部分分解すればそれに含まれる高分子量のブルランが低分子量のブルランよりも容易に加水分解を受け、次いで有機溶媒などで分画すれば、目的のブルラン画分が高收率で採取しうることを見いだし本発明を完成した。

本発明でいう原料ブルランとしては、部分分解した後、 M_w/M_n が15以下であるブルランが採取し得るものであればよく、一般には M_w が目的ブルランのそれよりも大きいものが適している。

部分分解の条件としては、原料ブルランが部分的に加水分解を受けて目的ブルラン画分が増量す

ればよい。その手段としては、例えばブルラン水溶液を、乳酸、クエン酸、塩酸、硫酸などの有機、無機酸類、或はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.18)、α-アミラーゼ(EC 3.2.1.1)、ブルラナーゼ(EC 3.2.1.41)、イソブルラナーゼ(EC 3.2.1.67)、イソアミラーゼ(EC 3.2.1.68)などの酵素類、超音波などで処理する方法が適宜採用される。工業的には、大量処理の容易な酸または酵素による部分分解法が適している。

このようにして部分分解したものから、目的ブルラン画分を得る方法としては、通常メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトンなどの親水性有機溶媒による分画法が用いられるが、必要に応じて、例えばゲル干過法、膜分離法などを用いることができる。

得られたブルラン画分は、通常、活性炭、イオン交換樹脂などによって脱色、脱塩して精製して目的のブルラン製品にする。この際、必要ならば、メンブランフィルターにて干過し、濃縮して無色

透明なシラップ状、またはさらに乾燥、粉末化して白色粉末状のバイロゲン無含有のブルラン製品にする。

このようにして得られたブルランは、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が15以下と分子量分布幅を狭めた高純度で水溶性の線状高分子であるので、水溶性高分子標準試薬として有利に利用される。例えば、グルコアガロースや液体クロマトグラフィーに利用される場合には、通常、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が18~11程度に分子量分布幅を狭めたブルランが好適である。この際、 \bar{M}_n を、例えば20,000、80,000、40,000、60,000、80,000などのように各種取りそろえて水溶性高分子標準試薬のキットを製造し利用することも好都合である。

また、本発明のブルランは、血漿增量用、血流改善剤などにも好適である。通常、 \bar{M}_w が80,000~90,000のブルランを固体物当り約4~10% (w/v) の水溶液にし、これに塩類、糖類などの等張化剤を加え、滅菌して血漿增量用または血流改善用注射剤を製造すればよい。

以下、実験に基づいて詳細に説明する。

第2表

手段	未分解	部分分解	
		酸	酵素
ブルラン収率(%)		16	48
			55

第2表の結果から明らかのように、原料ブルランをそのまま分画採取するよりも、部分分解した後に目的ブルランを分画採取する方が高収率である。

この原因を検討するために、部分分解ブルランを経時的にサンプリングし、ゲル干過法により分子量分布の変化を調べたところ、酸、酵素何れの場合においても、原料ブルラン中の高分子ブルランの方が、低分子ブルランよりも加水分解作用を受け易い性質を有していることが判明した。このことから、部分分解の程度を目的ブルラン画分が最大になるように適宜選択することによって約40~60%、またはそれ以上の高収率を得ることも容易になった。

また、酸で部分分解するよりも、酵素で部分分解する方がやや高収率であった。

実験1 分子量分布幅を狭めたブルランの製造

\bar{M}_w/\bar{M}_n が25であり \bar{M}_w が150,000の原料ブルランを10% (w/v) の水溶液とし、(A)未分解のまま、(B)硫酸酸性下(pH約2)で80℃に2時間保って部分分解した後中和し、また(C)酵素剤(α-アミラーゼ剤、長瀬産業株式会社製造、商品名・ネオスピターゼ)をブルラングラム当り糊精化力活性で550単位の割合で加えてpH5.5、温度80℃で20時間保って部分分解した後酵素を加熱失活させ、次いで、これら(A)(B)(C)を80℃に保ちつつ、それぞれにメタノールを48% (v/v) になるように加え生じた下層部を除去した後、得られた上層部にさらにメタノールを60% (v/v) になるように加えて静置した後、下層部を分画採取して乾燥粉末化し、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が14である \bar{M}_w 60,000のブルラン製品を得た。

本製品の原料ブルランに対する収率(固体物換算)は、第1表にまとめた。

実験 2 種々の \bar{M}_w/\bar{M}_n 値を有するブルランの静脈注射

\bar{M}_w が 60000 で \bar{M}_w/\bar{M}_n 値が 28, 20, 15, 12 である 4 種類のブルランを、生理食塩水に 6 % (w/v) に溶解し試験して静脈注射実験用の血漿増量剤とした。

これらの血漿増量剤 100 mg を体重約 80 kg の家兔に対し、約 15 分間で急速に静脈注射し、静脈注射時の静脈圧変化と、注入ブルランの排泄率を測定した。

静脈圧変化は、静脈注射開始前の静脈圧 (mmH₂O) と静脈注射終了時の静脈圧とを測定し、静脈注射終了時静脈圧の静脈注射開始前静脈圧に対する上昇倍数を求め、静脈注射時の循環系に対する負荷の指標とした。

また、静脈注射開始後 2 時間以内に尿中に排泄されたブルラン量を測定し、静脈注射ブルラン量に対する排泄率(%)を求める、その体内保持程度から血漿増量効果の指標とした。

実験の結果を第 2 表に示した。なお、示した数値は家兔 2 羽づつの平均値である。

第 2 表

\bar{M}_w/\bar{M}_n	28	20	15	12
静脈圧 (%)	21	17	18	12
排泄率 (%)	45	82	17	18
評価	劣	やや劣	優	優
	対照	対照	本発明	本発明

第 2 表の結果から明らかのように、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が 15 以下のブルランは、静脈注射時の静脈圧の上昇も少なく、また注入ブルランの急激な尿中排泄も少なく血漿増量用に好適である。

次に、 \bar{M}_w/\bar{M}_n が 28 であり \bar{M}_w が 60000 のブルランをゲルエ過法にて分画し、分子量 15000 以下のブルランと、分子量 15000 以上のブルランを採取し、前記と同様に家兔を使って実験したところ、分子量 15000 以下のブルランの場合は、静脈圧が約 12 倍であったが、尿中排泄率が約 80 % にも達し、逆に分子量 15000 以上のブルランの場合は、尿中排泄率が約 7 % であったが、静脈圧が約 8 倍にも達することが判明した。

これらの結果から、分子量 15000 以下のブルランの場合には、静脈注射後尿への排泄までの半減期が極めて短時間であり、これでは腎臓への負荷を高めるのみで、血漿増量剤としての効果がほとんど期待できない。また、分子量 15000 以上のブルランの場合には、急速な静脈注射により静脈圧をかなり上昇させることができたことから循環系への負荷を高めることができると想定される。

従って、血漿増量剤には、本発明者等が先きに昭和 54 年特許願第 68976 号で提案したブルランの \bar{M}_w が単に 80000~90000 であると言うだけではなく、分子量 15000 以下の低分子画分と、分子量 15000 以上の高分子画分とができるだけ減少させて分子量分布幅を狭めた \bar{M}_w/\bar{M}_n が 15 以下のブルランが好適である。

以下、2~8 の実施例を述べる。

実施例 1

\bar{M}_w/\bar{M}_n が 28 であり \bar{M}_w が 80000 である原料ブルラン 200 g を 20 % (w/v) の水溶液とし、硫酸を用いて pH を約 2 とし、80 °C に 2 時間保ってブルランの部分分解を行った後、カセイソーダで中和し、冷却して 80 °C に保ち、これにメタノールを 40 % (v/v) となるように加え、生じた下層部を除去した後、得られた上層部にさらにメタノールを 55 % となるように加えて静置した後、下層部を分別採取した。これからメタノールを留去し、残ったブルラン水溶液に活性炭を加えて脱色し、H 型および OH 型イオン交換樹脂にて脱塩し、さらにメンブランフィルターにてエ過し、得た精製ブルランを濾縮、乾燥、粉碎して \bar{M}_w/\bar{M}_n が 14 であり \bar{M}_w が 60000 であるブルランの白色粉末約 90 g を得た。

実施例 2

\bar{M}_w/\bar{M}_n が 26 であり \bar{M}_w が 80000 である原料ブルラン 200 g を 20 % (w/v) の水溶液とし、硫酸を用いて pH を約 2 とし、80 °C に 2 時間保ってブルランの部分分解を行った後、カセイソーダで中和し、40 °C に保ちつつこれにエタノールを 50 % (v/v) となるように加え、生じた下層部を除

去した後、得られた上層部にさらにエタノールを70% (v/v) となるように加え、生じた下層部を採取した。

これをさらに、実施例 1 と同様に処理して精製し、 $\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 1.8 であり $\overline{M_w}$ が 80000 であるブルランの白色粉末約 70g を得た。

实施例 8

M_w/M_n が 21 であり \bar{M}_w が 200000 である原料
ブルラン 200 g を 5% (w/v) 水溶液となし、実施
例 1 と同様に部分的分解した後、中和し、80℃
に保ちつつ、これにアセトンを 20% (v/v) とな
るよう加え、生じた下層部を除去した後、得
られた上層部にさらにアセトンを 45% (v/v) と
なるよう加え、生じた下層部を採取し、さら
に実施例 1 と同様に処理して精製し、 M_w/M_n
が 15 であり \bar{M}_w が 85000 であるブルランの白色粉
末約 80 g を得た。

实施例 4

$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ が 2.8 であり \overline{M}_w が 800000 である原料ブ
ルラン 200 g を 10% (w/v) 水溶液とし、これに、

同様 $\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 1.1 で $\overline{M_w} 20000$ を有するブルランの白色粉末を約 80 g 得た。

实施例 6

$\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 21 であり $\overline{M_w}$ が 200000 である原料
ブルラン 200 g を 5 % (w/v) 水溶液にし、市販の
アミラーゼ (EC 3.2.1.1) (長瀬産業株式
会社製造、商品名 ネオスピターゼ) をブルラ
ングラム当たり糊精化力で 500 単位の割合で添加
し、pH 6.4、温度 55°C に 24 時間保ってブルラン
の部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、
次いで実施例 8 と同様にアセトンにて分画し、
精型、濃縮、乾燥して実施例 8 と同じ $\overline{M_w}/\overline{M_n}$
が 1.5 で $\overline{M_w}$ 85000 を有するブルランの白色粉末
を約 110 g を得た。

实施例 7

$\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 28 であり M_w 200000 である原料ブルラン 200 g を 10% (w/v) 水溶液とし、これに市販イソアミラーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）をブルラングラム当たり 200 単位の割合で添加し、pH 4.8、温度 50 °C に 20 時間保つて

特開昭57-141401(4)

昭和58年特許出願公告第27791号公報で開示されているバチルス属細菌が生産したシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(EC 2.4.1.19)をブルラングラム当り糊精化力で150単位の割合で添加し、pH60、温度65℃に20時間保ってブルランの部分分解を行った後、90℃に15分間保って酵素を加熱失活させ、次いで、実施例1と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例1と同じ M_w/M_n が14で M_w 50000を有するブルランの白色粉末を得た。

实施例 5

$\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 26 であり $\overline{M_w}$ が 80000 である原料ブルラン 200g を 20% (w/v) の水溶液とし、これに、市販ブルラナーゼ（株式会社林原生物化学研究所製造）をブルラングラム当たり 4 単位の割合で添加し、pH 6.0、温度 50°C にて 80 時間保ってブルランの部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例 2 と同様にエタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例 2 と

ブルランの部分分解を行った後、酵素を加熱失活させ、次いで実施例1と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例1と同様 M_w/M_n が 1.2 で M_w 40000 を有するブルランの白色粉末を約 80 g 得た。

实施例 8

$\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 21 であり $\overline{M_w} 580000$ である原料ブルラン 200 g を 0.05M NaCl 水溶液で 10% (w/v) とし、これを 80°C に保ちつつ、出力 50 W、45 KHz の超音波発生器（商品名 Branson ultrasonic cleaner, Model 12, ヤマト科学株式会社製、東京）で 80 分間処理し、次いで実施例 1 と同様にメタノールにて分画し、精製、濃縮、乾燥して、実施例 1 と同じ $\overline{M_w}/\overline{M_n}$ が 14 で $\overline{M_w} 50000$ を有するブルランの白色粉末を約 70 g 得た。

特許出願人

株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原

昭 60.1.7 発行

特許法第17条の2の規定による補正の掲載

昭和56年特許願第156134号(特開昭57-141401号 昭和57年9月1日発行 公明特許公報57-1415号掲載)については特許法第17条の2の規定による補正があるので下記のとおり掲載する。3(3)

手続補正書

昭和59年7月23日

特許庁長官 志賀 学 殿

Int'l Cl.	識別記号	府内整理番号
C08B 37/00		7133-4C

1. 事件の表示

昭和56年特許願第156134号

2. 発明の名称

分子量分布幅を狭めたブルランの製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

岡山県岡山市下石井1丁目2番3号

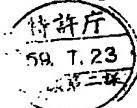
パシナセイブカガク
株式会社林原生物化学研究所

代表者 林 原 健



4. 補正の対象

明細書における「発明の詳細を説明」の項



方式 ()

5. 補正の内容

- (1) 明細書第4頁第10行記載の「この際、 \bar{M}_n を、」を「この際、 \bar{M}_w を、」に補正します。
- (2) 明細書第10頁第10行記載の「さらにメンブランフィルターにて」を「さらにメンブランフィルターにて」に補正します。
- (3) 明細書第11頁第10行記載の「部分的分解した後、」を「部分分解した後、」に補正します。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.